

QW
51
M911c
1918

Contribuição para o estudo das variações em microbiologia

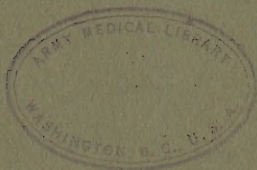
Trabalho original especialmente
elaborado e apresentado junto a outros
titulos e publicações

PELO

Dr. Arthur Moses

Assistente do Instituto Oswaldo Cruz

Afim de habilitar-se para a livre docencia da cadeira de microbiologia



RIO DE JANEIRO

Typ. do Jornal do Commercio, de Rodrigues & C.

1918

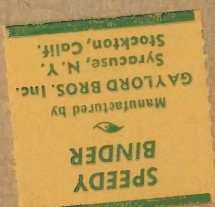
QW 51 M911c 1918

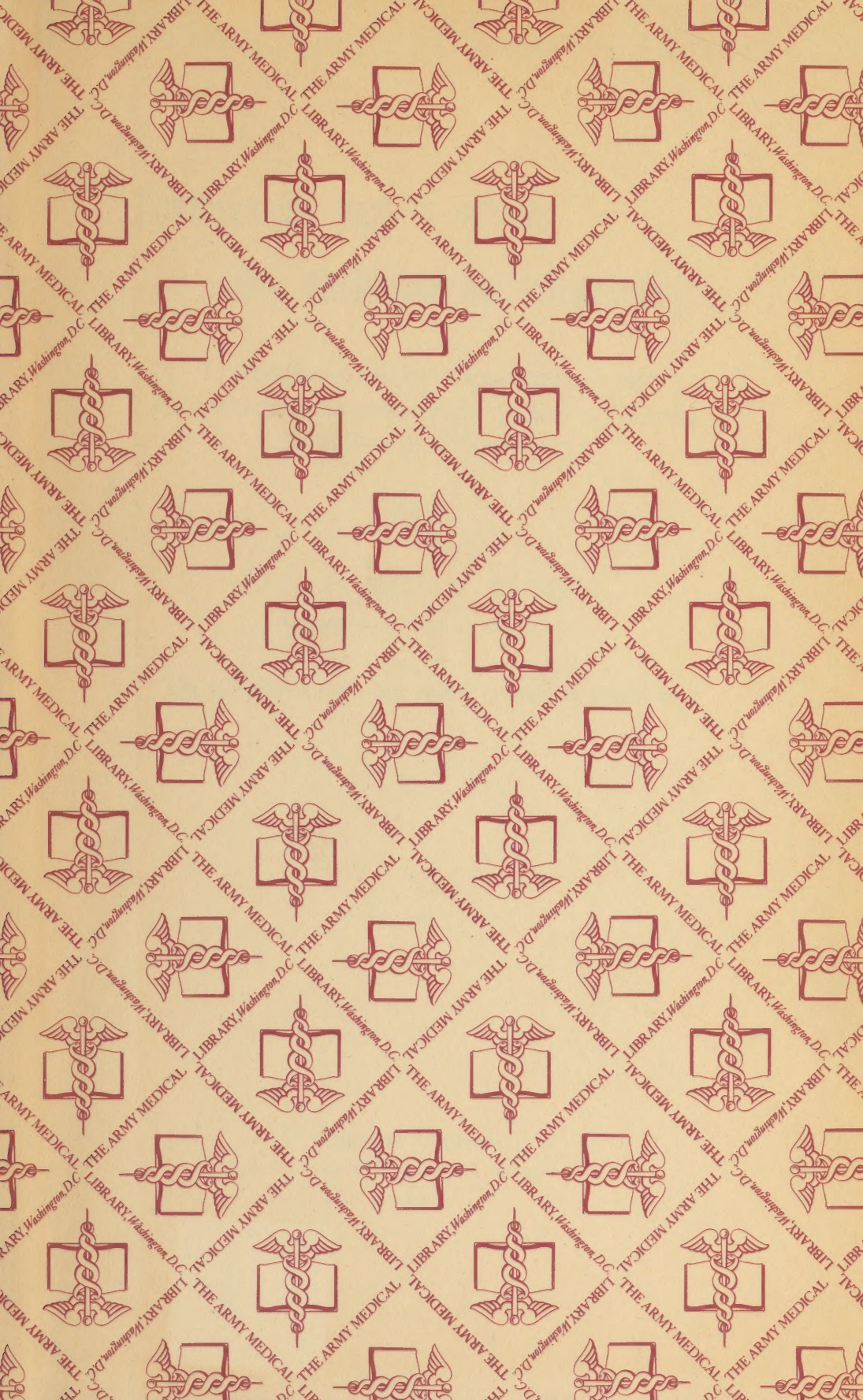
11330265R



NLM 05078563 0

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE





Contribuição para o estudo das variações em microbiologia

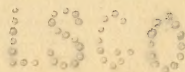
Trabalho original especialmente
elaborado e apresentado junto a outros
titulos e publicações

PELO

Dr. Arthur Moses

Assistente do Instituto Oswaldo Cruz

Afim de habilitar-se para a livre docencia da cadeira de microbiologia



RIO DE JANEIRO

Typ. do *Jornal do Commercio*, de Rodrigues & C.

1913

Annet

QW

51

M911c

1918

C.1

Gift
Author
Nov. 22, 1943

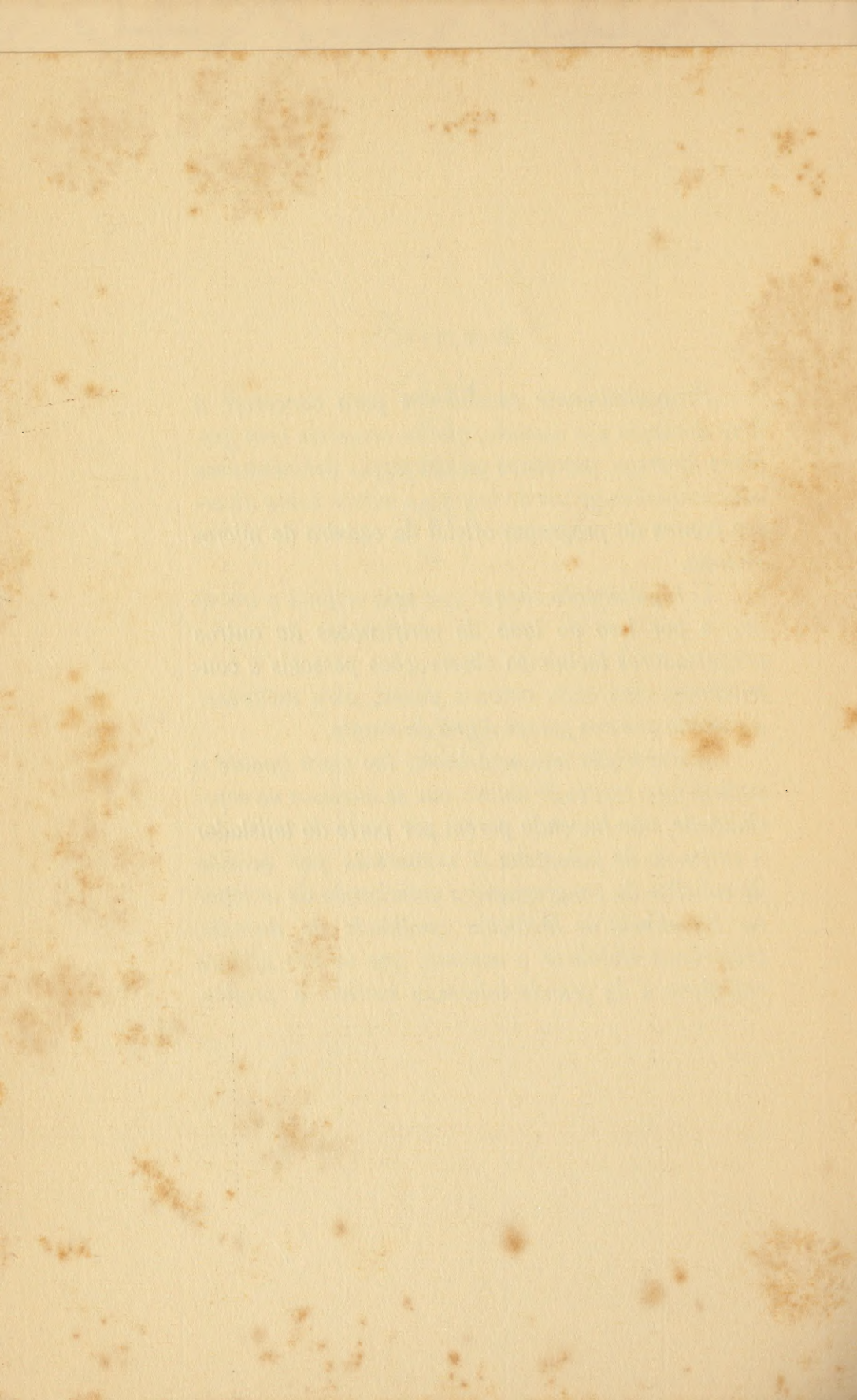
0021

T 6/13/51

Propositalmente escolhemos para concorrer á livre docencia um assunto, que se occupasse com germens diversos, patojenos ou não e que demonstrasse conhecimentos gerais de tecnica e leitura sobre diversos pontos do programa oficial da cadeira de microbiologia.

O regulamento requer que seja orijinal o trabalho, e por isso ao lado de verificações de outros pesquisadores incluimos observações pessoais e contribuimos com algo, embora pouco, para esclarecer a questão que nos parece digna de estudo.

A exposição não será talvez tão clara quanto a pediria uma turma de alunos que se iniciasse na especialidade, não havendo porem por parte do legislador a exigencia de patentear o requerente por ocasião de solicitar da congregação a autorisação de lecionar na Faculdade de Medicina qualidade de docente, preferimos sintetizar o assunto, que se nos afigura complexo e de grande interesse teorico e pratico.



A dificuldade em enquadrar nas descrições clássicas muitos dos bacterios patojenos, quer os de longa data conservados e transplantados no laboratório, quer mesmo os de recente isolamento, de ha muito chamou-nos atenção, principalmente no correr de estudos sobre germens do denominado grupo colitifo, onde cada vez mais se complica a determinação dos bacilos, que dele fazem parte, poiz muito frequente se tornou nos ultimos anos o isolamento do homem e suas proximidades, de bacilos semelhantes ao escantilhão tipo, porem deles se afastando em um ou mais pontos.

Ainda mais o estudo de escantilhões de germens outros como sejam de vibrião da colera veio mostrar-nos que o periodo da bacteriologia, em que se manteve como dogma a absoluta constancia dos caracteres de especie cedeu logar com os modernos trabalhos a outro em que este assunto ocupa pelo menos o logar de questão controversa.

Os trabalhos sobre variabilidade dos bacterios não são mais em pequeno numero. Para a questão chamaram a atenção dos microbiologistas DE VRIES,

JOHANSEN e TSCHERMACK, provocando uma revisão do material existente de modo a poder-se hoje estabelecer em base racional a teoria da variação bacteriana.

Precederam estas verificações outras sobre sacaromicetos, devidos principalmente a HANSEN e BEIJERINCK.

Novos horizontes se abriram na bacteriologia com as observações de NEISSER, MASSINI, REINER MUELLER, BURRI, SOBERNHEIM e SELIGMANN, ALTMANN e RAUTH, WOLF, BAERTHLEIN, KRUSE, GÖTTSCHLICH, etc.

Com o progredir constante dos conhecimentos sobre biologia dos bacterios ainda outra questão se ajita no capitulo das variações entre microorganismos, qual seja a da interpretação destas variações, incluindo-se hoje muitas delas entre as mutações no sentido de DE VRIES, cujas observações sobre formação de novas especies na *Oenothera* e subsequente publicação no ano de 1901 do primeiro volume sobre a teoria das mutações constitue marco notavel no capitulo da formação das especies.

Embora admitidas em anteriores trabalhos por DARWIN como uma das modalidades de evolução, caracterizada pelo aparecimento repentino e espontaneo de novas formas, ao lado de outra em que se dá o acumulo gradual de variações sempre flutuantes

e presentes, que motivaram a observação que numa dada raça nunca se encontram 2 individuos absolutamente identicos, foi DE VRIES quem primeiro chamou atenção para as mutações.

Negado por WALLACE, de cuja autoridade não ha que duvidar, é hoje fato admitido a existencia de mutações, limitando-se a discussão a saber se se deve consideral-as fator principal de evolução ou se ainda representam papel mais importante as modificações lentas e graduais.

Podem as mutações ser progressivas ou regressivas ou ainda digressivas quando resultam da volta ao estado potencial de caracteres latentes.

Entre os vejetais é certo que alteradas as condições de vida póde-se sobre eles exercer influencia directa tal que apoz um dado numero de gerações se obtenha individuos que pelos caracteres morfolojicos ou manifestações funcionais em nada se assemelham ao primitivo tipo.

Os tipos obtidos por mutação se distinguem dos obtidos por simples variação pela constancia dos primeiros e inconstancia dos segundos.

Admitido de acordo com os trabalhos sobre vejetais que a mutação tenha como principal fator condições internas e que se limita a relativamente poucos individuos de uma mesma especie, os microbiolojistas, pelo contrario, afirmam a necessidade de provocação

devido a irritação externa e a possível generalisação a muitos indivíduos do mesmo escantilhão, prestando-se por vezes a confusão com a degeneração que atinge todos os indivíduos do tubo de cultura.

PRINGSHEIM entre aqueles que negam a mutação nos microorganismos, chamou atenção para o facto de serem estas em geral de natureza morfológica nas plantas, ao passo que nos bacterios caberiam perfeitamente no limite natural da variação do microorganismo as pequenas alterações de morfolojia muitas vezes observadas.

Diremos algo sobre os trabalhos conhecidos referentes a variações em microorganismos, incluindo observações pessoais e a proposito dos casos de mutação falaremos dos argumentos apresentados em contrario. De 1885 data um trabalho de SCHOTTELIUS sobre *micrococcus prodigiosus* e novamente na publicação jubilar em honra ao professor KÖLLIKER refere-se este autor a variações observadas em um cogumelo.

Mais tarde citam-se os trabalhos de BEIJERINCK sobre mutabilidade em algas *chlamydomonas* e *chlorella*, levedos de fermentação alcoolica, de eter acetico... BEIJERINCK acredita que quando examinados durante espaço suficiente de tempo todos os microbios apresentam mutações.

Em 1897 NEUMANN descreveu um germen pio-

jenico roseo obtido da variedade *aureus* e volta atávica posterior ao tipo de onde tinha partido. Em 1901 LEUCKHARD se refere a um *Bacillus prodigiosus* que durante muito tempo germinou com a coloração branca e subitamente de novo voltou á cultura vermelha.

Da literatura é facil inferir que é mais corrente verificar-se entre os bacterios variações sob a influencia de condições externas ou adição de produtos químicos, terminando ás vezes por se tornar duradoura a propriedade alterada, que se transmite por herança sem que possam ser incluídas no numero das mutações onde de repente, em um salto, de uma especie sem especial propensão para variar se origina um individuo com novas propriedades, que hereditariamente se transmitem.

Em 1906 numa das reuniões da Freien Vereinigung für Mikrobiologie, M. NEISSER e MASSINI applicaram pela primeira vez aos bacterios as teorias de DE VRIES, descrevendo o desenvolvimento anormal do *b. coli commune* e considerando o tipo de mutação.

Trata-se do *Bact. Coli Mutabile* isolado de um caso de gastroenterite no decimo dia de molestia e que constitue trabalho de grande interesse biologico. Este germen de mutação como o denomina o autor, quando semeiado em agar de Endo fornecé ao contrario do *coli commune* colonias descoradas que não

são entretanto tão transparentes como as de bacilo tífico.

Quando transplantadas no espaço de vinte e quatro horas mantinham-se descoradas continuando assim durante 20 transplantações successivas sem nunca fornecer a classica colonia de intensa cor vermelha e brilho metalico.

Apoz trez a quatro dias de germinação ao lado das colonias mencionadas encontravam-se outras ainda descoradas com nodulos do tamanho de cabeça de alfinete, branco amareladas que pouco a pouco á medida que germinavam tomavam cor vermelha escura. Quando transplantados os nodulos vermelhos forneciam sempre colonias da mesma cor. Propriedades aglutinantes e ação patojenica dos germens dos dois tipos de colonia eram identicas.

Não se encontraram fazes intermediarias de passagem entre uma e outra colonia. O simples agar a 2 % com lactose a 1 % e até 0,1 % era suficiente para manter o tipo de colonia dispensando o meio de Endo. Não se consegue, no entanto, obtel-as substituindo a lactose pela glicose, manita ou dextrina, tendo-se observado que em presença de qualquer dos dois ultimos assucares o germen não resistia mais de 4-6 dias.

O *B. Coli Mutabile* foi ainda visto por ARNOLD BURK, SAUERBECK, KONRICH, R. MUELLER, etc.

Nos diversos meios aconselhados para diagnostico diferencial do bacilo tifico os escantilhões de mutação que fermentam lactose apresentam apoz 24 horas de germinação a 37° o desenvolvimento tipico de *B. Coli* e os outros tomam aspeto de bacilo paratifico do tipo B.

De fezes de doente de infeção intestinal ARNOLD BURK isolou um germen comportando-se de modo identico ao comunicado á reunião de microbiolojistas por M. NEISSER e depois descrito por seu dicipulo R. MASSINI, sob a denominação de *B. Coli Mutabile*. Segundo SAUERBECK tres escantilhões de *coli mutabile* por ele isolados forneceram colonias vermelhas e brancas, desenvolvendo-se as primeiras como coli e as segundas como paratifo B. Um deles forneceu em agar de DRIGALSKI-CONRADI colonia azul que mais tarde tornou á cor vermelha. BAERTHLEIN que com grande cuidado se ocupou de variabilidade nos bacterios pesquisou em fezes de individuos normais, tuberculosos e disentericos a existencia de *B. Coli* e encontrou dois tipos de colonia bem diversos, um transparente formado de germens delgados e compridos e outro opaco, branco amarelado formado por bacilos curtos e cheios. Apoz germinação durante 24 horas em agar com lactose uma e outra colonia fornecia outras apresentando nodulos branco amarelados assemelhando-se a botões. Mantinham-se con-

stantes as propriedades dos diversos mutantes, embora transplantados para outros meios solidos sem assucar ou inoculados em animais de experiencia.

Por diversas vezes trabalhando com cultura de *B. Coli* de laboratorio ou ainda de isolamento recente pudemos observar na mesma placa colonias grandes, brancas, redondas, humidas e opacas ao lado de outras claras, brilhantes, redondas e chatas.

BURRI descreve ainda um *B. Coli*, a que denomina de *imperfectum* que não fermentava sacarose ou lactose e que no entanto fermentava o primeiro quando semeiado em meio de cultura com ele preparado, recebendo então a denominação de *perfectum*. Em 1º logar isolado de capim, depois de fezes de boi e por-nos uma vez de fezes de cavalo o *B imperfectum* aproxima-se do bacilo paratifico B, dele se afastando pelas propriedades aglutinantes.

Tivemos tambem ocasião de observar no correr dos estudos um *B. Coli* que em agar de DRIGA SKI fornecia ao lado de grande numero de colonias vermelhas algumas pequenas, azues e redondas que com o tempo se tornavam roseas.

Não é só entre os bacilos coli que se tem verificado escantilhões que de tal modo se afastam da descrição classica a ponto de dificultar o reconhecimento. MANDELBAUM descreve o *B. metatyphi* que em presença de glicerina produz alcali ao contrario do

que se dá com o bacilo tífico que produz acido. Em agar glicerinado e acido rosolico o bacilo de EBERTH se apresenta sob a forma de colonia amarela e o de MANDELBAUM sob o de colonia vermelha. Em agar glicerinado sangue o bacilo tífico apresenta uma orla parda e o metatífico não altera a hemoglobina. Até hoje não se conseguiu transformar um bacilo metatífico em outro tífico.

O *B. metatyphi* fornece ás vezes colonias que se portam como os de bacilo tífico, sendo entretanto mais virulentas que estes e constituirão provavelmente uma regressão atavica; outros no entanto mantêm as propriedades adquiridas durante 4 anos e meio. Admitido por muitos pesquisadores, para OTA o bacilo metatífico não se distingue do tífico classico.

O tipo de MANDELBAUM é raro. Entre 110 escantilhões de bacilos da febre tifoide que lhe foram enviados para estudo, de pontos diversos, REINER MUELLER só o encontrou uma vez na coleção de germens do Instituto da Universidade de MUNICH e NETTER não viu um só entre os germens por ele examinados. RUSSOWICI encontrou um em seis tubos de cultura estudados. DITTHORN e LUERSSEN viram dois que se apresentavam sob a forma de colonia rosa com orla vermelha em agar glicerinado com acido rosolico. São germens que nos primeiros dias produ-

zem alcali e depois acido em presença de glicerina e que segundo os autores da verificação não constituem formas intermediarias mas sim de mutação no organismo e remutação na placa. Em agar de Endo substituida a lactose pela rammose MUELLER obteve colonias brancas com botões vermelhos semelhantes ás do *b. coli mutabile*. Algo de semelhante foi ainda comunicado sobre os bacilos paratifico B e da disenteria tipo FLEXNER.

Em todos estes casos trata-se de uma propriedade adquirida e que a amostra primitiva não possuia, surjindo sempre a duvida se esta aquisição se fez de modo repentino ou se pelo contrario se observa lenta introdução da nova propriedade. E assim se repetem as observações cabendo a JACOBSEN, confirmando-o REINER MUELLER, isolar em uma epidemia de febre tifoide na Dinamarca um *B. typhi mutabile* que com dificuldade se desenvolvia em agar de DRIGALSKI CONRADI, dada a forte ação impiediente do meio de cultura.

De culturas puras destes bacilos passados para agar obteve ao lado de colonias muito pequenas que continuavam a germinar com dificuldade, outras que se desenvolviam de modo facil cessada portanto a ação impiediente.

Ha muito tivemos ocasião de fazer uma observação semelhante a que então ligamos pouca importan-

cia. As colônias pequenas constituem um tipo de mutação que se distingue pela fermentação ácida em caldo e manita (50 h) e fraca aglutinabilidade — 1/10 contra 1/10.000.

Admitido como querem alguns que a ação impediante corra por conta da ação da autoclave sobre o agar durante o preparo teremos quando muito um caso de variação. BAERTHLEIN é de todos o que com mais cuidado observou diferenças nos tipos de colônia de bacilos da febre tifoide, verificando ao lado de colônias transparentes e claras, outras opacas e homogêneas. A cada tipo de colônia corresponde um tipo de germen. Ainda algumas se encontram em forma de folha de parreira com os contornos regulares, ao lado de claras com centro branco amarelado. A's primeiras corresponde o tipo de germen curto e fino, ás segundas o de germen curto e cheio. A esta diferença assinalada em agar não corresponde diferença alguma nos meios outros ou na reação de imunidade.

De interesse teorico grande esta diversidade de tipos de colônia não encontra aplicação importante na pratica porque aparece em culturas velhas, ás vezes de 2 a 3 mezes. Em culturas antigas estende-se aos outros germens do grupo identica diversidade de aspecto macroscopico de colônias, produzindo confusão no espirito de quem procura identificar uma cul-

tura nestas condições. Em escantilhões de *B. paratifico suipestifer* e *typhus murium* encontram-se colonias grandes e opacas ao lado de pequenas, homogêneas e irisadas.

Curioso é que sempre corresponde um tipo de morfologia diverso ao aspeto diferente da colonia. São os primeiros constituídos por germens curtos e cheios e os segundos de germens longos e finos.

Entre os bacilos paratíficos ha ainda descrições de colonias claras azuladas ao lado de outras opacas, amarelas com tom avermelhado. Os segundos são formados por germens curtos e cheios assemelhando-se a cocos e os primeiros de germens ainda curtos, porem finos.

E assim succedem-se as descrições complicando cada vez mais o diagnostico dos germens que hoje se capitulam no grupo dos bacilos paratíficos tipo B, querendo alguns admitir que haja bacilos paratíficos e *psitacosis* que sofram mutações transformando-se em *b. enteritidis*.

Em escantilhões de bacilos paratíficos ao lado de colonias grandes e transparentes tem-se observado na mesma placa outras branco amareladas com reflexo madreperola. E' do 5º ao 14º dia em culturas em agar commum que aparecem estas colonias consideradas como mutantes.

O fato de se manterem atravez de diversas ge-

rações estas diversas propriedades adquiridas fez com que fossem incluídas entre as mutações, admitido que tenham aparecido em massa, repentinamente e sem fase intermediária; porquanto as variações são inconstantes e desaparecem rapidamente logo que deixem de influir as condições alterantes, quer seja temperatura, ação de autoclave, ácido fenico, arsenico, quinino, etc.

Assim em 1908 BRASSBERGER e ENGLING descreveram escantilhões de b. tífico que cultivados a 37° não se deixavam aglutinar, ao passo que o eram quando cultivados na temperatura baixa de 22°. Chegam ainda mais longe alguns e admitem a possibilidade de transformação de um bacilo tífico em paratífico do tipo B, assim é que REINER MUELLER, afastando qualquer idéa de infecção mixta observa em culturas em agar de DRICAISE mantidas em temperatura ambiente durante onze dias ao lado de colônias de bacilo tífico já verificadas no primeiro dia, colônias filhas semelhantes a botões e que transplantadas para gelatina verificou serem de bacilo paratífico do tipo B.

Até agora vimos apenas a dificuldade em reconhecer colônias dos bacilos tífico, paratífico A e B e coli. Veremos como diminuem as probabilidades do êxito quando a pesquisa se refere a um dos germens do grupo *enteritidis* ou então a um dos bacilos da

disenteria. Lembramos aqui as duvidas que tivemos ao estudar um caso de infeção pelo bacilo GAERTNER dada a imobilidade absoluta do germen isolado, levando-nos a principio a admitir que se tratasse de um bacilo da disenteria. Conhecem-se pesquisas que afirmam a obtenção de um *b. enteritidis* *Haustedt*, de colonias filhas dos seguintes germens: *enteritidis Gaertner*, tifico, bacilo que se aproximando do de Gaertner pelos demais caracteres dele se afasta pelas propriedades de aglutinação, *b. coli commune* e *coli mutabile*.

Rejistamos aqui este resultado sem negal-o nem confirmal-o, julgando-o entretanto digno de uma **reverificação**.

Entre os bacilos da disenteria é tão grande a variabilidade no aspeto das colonias e na morfologia dos germens que em pesquisas feitas em alguns casos de disenteria por ocasião da epidemia reinante nos suburbios, em 1912, certamente teriamos errado o diagnostico se não nos valessemos dos caracteres biológicos.

O aspeto das colonias que por muitos é dado, como sendo habitualmente de folha de parreira, não é o unico que se vê nas placas; alem destas encontram-se algumas transparentes, constituídas por germens longos e finos e outras branco amareladas opacas de contorno regular e formadas unicamente por

germens curtos e cheios. Em geral é de 3—4 semanas o prazo necessario para observação de mutações entre os bacilos da disenteria. Existem entretanto germens na disenteria que mesmo por ocasião do isolamento se aproximam morfolojicamente dos bacilos disentericos e que pelas propriedades culturais e sorolojicas deles se afastam por completo. Em meios de *Barsiekow* I e II, *Petruchsky*, *Löffler*, *Rothberger* no caldo lactosado, leite, agar com orceina aproximam-se antes do bacilo tifico.

Este germen por não produzir indol dir-se-ia a primeira vista um bacilo tifico atipico imovel porem sem cilios, não aglutinado pelo soro antitifico e negativo o fenomeno de PFEIFFER impõe-se o afastamento desta hipotese e a criação de um escantilhão atipico de bacilo da disenteria.

Baseado na prova de Castellani KRUSE admite além dos tipos SHIGA, FLEXNER, STRONG e Y mais seis outros atipicos. Outro ponto que desejariamos ver esclarecido é a distribuição segundo a fermentação de assucares dos bacilos em subgrupos dentro dos dois grandes grupos de germens produtores e não produtores de toxina.

Temos verificado ser comum falhar este criterio de subdivisão nos germens que não tenham sido isolados recentemente. A propria aglutinação não permite em casos excepcionais distinguir um do outro os

quatro tipos aceitos. Em casos de disenteria bacilar, ainda dos suburbios, observados no ano passado, tivemos ocasião de observar colonias atípicas coincidindo com a morfologia muito pouco típica do germen. Fezes mucopurulentas e sanguinolentas trazendo logo a suspeita de se tratar de disenteria bacilar foram semeiadas em agar de DRIGALSKI sem cristal violeta como determina a tecnica e ao lado de colonias opacas, grandes, de contorno irregular formados por germens curtos e cheios vimos outras claras, pequenas, de contorno regular e formadas por bacilos finos e longos.

Um e outro eram aglutinados pelo soro aglutinante para bacilo disenterico *Shiga Kruse* na diluição de 1:160, sendo negativa a aglutinação com soro para bacilo de *Flexner*. Cultura de uma semana em caldo filtrado em vela e inoculado em coelho por via venosa determinava paralisia caracteristica da toxina disenterica, o que nos fez concluir pelo diagnostico de bacilo da disenteria a principio indeciso. Uutimamente tivemos ocasião de estudar fezes disenteriformes que semeiadas em agar de DRIGALSKI forneciam colonias cujo aspeto era o das de bacilo da disenteria tendendo ainda o exame em preparação corada e em gota pendente para o mesmo diagnostico. Estudo posterior mostrou tratar-se de germen banal não patojenico.

Duvidas semelhantes assaltaram-nos o espirito

ao examinar casos suspeitos de disenteria na escola premunitoria Quinze de Novembro, onde finalmente firmámos o diagnostico concluindo pela existencia de bacilo de Shiga nas fezes.

Acreditamos assim quasi impossivel excluir de ulterior exame colonias que não correspondam á descrição classica. Deve-se pelo contrario estudar os diversos tipos de colonia encontrados na placa, deixando de continuar os exames tão sómente quando do conjunto de caracteres se possa ter idéa qual o germen que se tem em mão.

Teremos assim, a menos que se conceda limites muito largos ás propriedades morfolojicas dos bacterios, casos de mutação no proprio organismo dificultando de modo extraordinario a pesquisa em casos de molestia infetuosa. Não se pode neste caso admitir a influencia da autoclave sobre o meio de cultura, da temperatura ou de outro qualquer fator externo, porque forçoso será convir que devia ser identica a ação sobre todos os bacilos da disenteria que se encontrassem nas fezes, de modo que embora afastando-se do tipo primitivo deveriam ser identicas todas as colonias encontradas na placa. Constitue ainda fato frequente encontrar-se do mesmo intestino escantilhões diversos de *b. coli* ou de *b. tifico* nas mesmas fezes e que transplantados em cultura pura são aglutinados em titulo diverso pelo soro especifico. Admittida,

como o quer SMITH, a unidade de escantilhões de *b. coli* na creança de peito torna-se necessario admitir a diferenciação das amostras no intestino.

Antes de abordarmos outra face da questão qual seja a da variação apresentada por bacilos diversos depois de habituados a produtos quimicos diferentes como sejam acido fenico, verde malaquita, etc., vejamos ainda o que sobre o assunto que nos prende ha feito em outros bacterios como sejam o da peste, do carbunculo, da colera, vibriões simile colericos e *b. prodigiosus*.

GÖRTSCHLICH descreve em dois casos cronicos de peste um no gato e outro em bubão supurado no homem colonias redondas de bordo liso, afastando por completo o diagnostico de peste pelo exame da cultura. De virulencia diminuida e aglutinado em baixa diluição por um soro cujo titulo era de 1.1000, este germen conservado na geleira durante dois mezes e depois transplantado para agar apresenta subitamente volta atavica ao tipo bem conhecido de colonia de bordo recortado e de grande virulencia que se encontra nas descrições do bacilo de Yersin.

Desde que nos ocupamos com a peste não temos tido occasião de observar casos de peste no homem. Achamos curioso assinalar em culturas de germen isolado do rato e de cobaia por occasião de passagem em animal para manutenção da virulencia, bacilos de

morfologia a mais diversa, desde o classico coco bacilo até formas longas e finas e outras muito curtas e finas, afastada qualquer idéa de contaminação, dada a unidade de tipo de colonia observada nas placas semeiadas.

Em velhas culturas de vibrião colérico pudemos observar não só colonias claras, transparentes, azuladas e irisadas como é habitual encontrar, mas ainda outras branco amareladas lembrando bacilo coli. Não raro se dá a predominancia deste ultimo nas placas de agar alcalino aconselhado por KOCH para isolamento do vibrião.

BAERTHELEIN que observou as duas modalidades mencionadas de colonia ainda se refere a uma terceira branco amarelada com centro opaco e zona circular periferica clara. A's primeiras e terceiras correspondem bacilos curvos e finos de coloração homogenea; ás segundas, germens curtos e grossos com coloração bipolar ou então curvos mais compridos correndo-se em segmentos.

Os germens curtos e grossos de coloração bipolar não os pudemos observar. Em caldo mantem-se as diferenças de coloração e de morfologia mencionadas. Quando é fraco o poder hemolitico só as amarelas a possuem, quando forte é nestas que primeiro se manifesta.

Em culturas cultivadas na temperatura de 28-30°

poude EISENBERG observar colonias de transição entre uma e outra das descritas por BAERTHLEIN.

Este pesquisador refere ter isolado por diversas vezes de fezes de casos de infecção intestinal germens cuja morfologia era a do vibrião colerico e cujas propriedades culturais faziam aproximal-os do *b. faecalis alcalijenes*.

Entre os simile colericos, Firtsch em 1885 descreveu em culturas de *V. PROTEUS* em placas de gelatina muito tempo conservadas sem transplantação no laboratorio, colonias liquefazendo francamente o meio de cultura e outras em que a liquefação era quasi nula o que a principio fel-o suspeitar de uma contaminação. Seria fastidioso e fora das normas do presente trabalho continuar a estudar todas as variações rejistadas em bacterios. Occupar-nos-emos, ainda que sucintamente, de variações que possam sobrevir em bacterios tratados por produtos quimicos diferentes. Neste sentido são trabalhos bem conhecidos os de MARK LEWIS que trabalhou com um bacilo paratifico do grupo hog-colera submetido á ação prolongada do acido arsenioso. Anteriores a estes trabalhos existem os de DANYSZ, RUPPEL e outros. Aumento lento da quantidade de acido arsenioso e transplantações sucessivas em meios de cultura contendo determinada dose do produto mostram que a resistencia se faz não por progressão e sim por etapas. A's vezes

mantem-se as propriedades adquiridas, mesmo quando durante mezes não se cultive o germen em meio contendo arsenico.

O germen torna-se logo imovel readquirindo os movimentos quando transplantado para agar simples. Os germens se apresentam menores e com numero menor de cilios dispondo-se em cadeias e em agar de Endo as colonias são ora brancas, ora vermelhas, ora vermelhas com centro branco.

Aumentada a quantidade de acido arsenioso o germen se apresenta vermelho com tipico brilho do bacilo coli. O germen acaba por não fermentar glicose e não alterar o sôro do leite, ao contrario do que se dava a principio. A volta ao tipo primitivo só se dava após numerosas passagens em agar simples. SEIFFERT estudou a resistencia do b. coli ao verde malaquita e as variações nas culturas assim tratadas que voltam ao primitivo desde que cessa de atuar a substancia quimica.

Em culturas em agar tendo acido fenico ALTMANN e RAUTH observaram alterações sorologicas notaveis. Em uma serie grande de escantilhões de bacilo tifico, coli, paratifico A e B, enteritidis Gaertner e Günther fizemos algumas observações que julgamos interessantes accrecentar ás já citadas.

Seguindo a tecnica de adaptação lenta e acrescentando de cada vez quantidades muito pequenas

de cafeína em uma série de experiências e de cristal violeta em outra, conseguimos habituar os germens a cada um destes produtos. Observámos em um dos escantilhões de coli assim adaptado colonias brancas quando em agar de Endo, aparecendo mais tarde raras colonias vermelhas que transplantadas davam culturas puras que de novo semeiadas em meio de Endo forneciam colonias sempre vermelhas.

As brancas, no entanto, transplantadas para Endo mantinham-se sempre descoradas. Notámos ainda de interessante que em uma cultura de bacilo *enteritidis* Günther cujo tipo normal se apresenta em agar de Endo sob a forma de colonias grandes humidas roseas ou brancas, quando habituada á cafeína se apresenta ora sob a forma de colonia vermelha, ora com o centro roseo e a orla branca.

Transplantadas no mesmo dia mantinham as propriedades adquiridas perdendo-as logo que voltavam ao agar simples.

Os germens assim tratados perdiam completamente a motilidade, readquirindo a cessada a influencia da cafeína. A aglutinação por sôro específico de alto titulo mesmo quando a pesquisa se fazia com o germen de imunisação sofria influencia dadaptação á substancia quimica ficando muito áquem do titulo do sôro.

Com cristal violeta obtivemos variações de bacilos tífico, enteritidis, paratífico A e B e coli.

Depois de suficientemente habituados ao produto químico conseguimos que de 14 escantilhões de bacilo tífico a maioria se cultivasse em agar de Endo sem se afastar a reação da normalmente observada. Em meio de Drigalski observámos que o b. coli só envermelhecia ligeiramente o agar, pouco se assemelhando á reação classica.

A imobilidade do germen e a fraca aglutinabilidade foram ainda objeto de observação. Nos outros meios de cultura, de Barsickow, Rothberger, Petruschsky, etc., não observámos alteração.

Se continuássemos a colijir trabalhos sobre variações de microorganismos devidas á presença de substancias quimicas veríamos em primeiro logar os de CZAPLEWSKI e WASOKOWICZ que em seguida a successivas passagens em caldo com acido clorhidrico puderam obervar *b. prodigiosus* inteiramente sem côr e que em agar simples retomaram a côr vermelha.

Deste mesmo bacilo tem se descrito seis mutações diversas sendo que algumas delas podem mutar novamente oferecendo qualquer delas o quadro da regressão atavica. O descoramento neste germen pôde tambem ser obtido em presença do sublimado. Estas alterações são transmissiveis por herança.

Outras não transmissíveis foram observadas devidas á elevação de temperatura, ação de acido fenico, sulfato e acetato de cobre e sulfato e nitrato de cobalto. A simples transplantação em meio normal de cultura determinava o desaparecimento destas alterações que eram passageiras devendo-se antes capitalizar-as entre as modificações de NÆGELI e não entre as mutações que são constantes e hereditarias.

Ao começarmos o trabalho dissemos que a variabilidade dos microorganismos era questão que pelo menos se devia admitir como controversa, outro tanto diremos agora das mutações.

Se vacilamos em admitil-as quando se manifestam por caracteres morfolojicos, dado o pleomorfismo exajerado dos bacterios, mais hesitante ainda fica o pesquisador quando as manifestações são de natureza biologica porquanto é em extremo difficil dizer se existe o carater de subitaneidade exigido por DE VRIES ou se pelo contrario o que existe é uma ação gradual atravez de diversas gerações. E' assim que BURRI acredita que existam escantilhões de *b. coli* que possuem para alguns assucares poder latente de fermentação que póde passar para o estado ativo, desde que sejam cultivados em meio contendo o dado assucar. Não nos esqueçamos, entretanto, que para DE VRIES a mutação é a expressão de alguma condição oculta ou de tendencia latente existente em todas as especies.

Outra critica aventada por BURRI é a regularidade e segurança de uma reacção quimica com que entre os bacterios aparecem as mutações, incluindo-se entre estas as propriedades adquiridas devidas á exclusiva adição de hidrocarbonados. O desaparecimento muitas vezes observado da propriedade com a ausencia do assucar é outro motivo de reparo por parte de muitos pesquisadores. E' verdade que a fixação da propriedade por herança não póde por si caracterisar a mutação, conforme de passagem tivemos ocasião de escrever, porque existem adaptações que se mantem em identicas condições.

MARKOFF que estudou variações em carbunculo dando como causa directa das mesmas a idade da cultura, temperatura, humidade e condições individuais do germen e encontrou cinco variedades em 53 escantilhões não acredita na existencia de mutações. Também é deste parecer BENEKE. PRINGSHEIM que egualmente se filia a esta opinião julga mais acertado usar do termo variação e excluir da microbiologia o de mutação, que só tem a faculdade de complicar a questão. Simplifica ainda o assunto denominando flutuação ás variações que correm por conta de condições internas e adaptação e acomodação áquelas devidas a condições externas. A's flutuações pertenceriam as raças morfolojicas de *saccharomyces anomalus* e *b. coli commune* assim como as variações

patológicas que conduzem á formação anormal de cadeias de paramecios.

As raças descoradas devidas á temperatura elevada, má nutrição, influencia de toxicos, longa manutenção em meios de cultura obter-se-iam por seleção. O *b. coli mutabile* seria na opinião do autor devido a uma adaptação e os cogumelos asporojenos a seleção e adaptação.

De todas as observações citadas é aquele que diz respeito ao *b. coli mutabile* o que mais desperta atenção, havendo por parte de alguns dúvidas quanto á absoluta pureza das culturas. BURRI entre estes não isenta de causas de erro as próprias observações e PETRUCHSKY confessa ter errado quando communicou a transformação do *b. faecalis alcaligenes* em *b. tifico*.

Para solver esta duvida recomenda-se empregar a tecnica de BURRI para obtenção de culturas unicelulares e mesmo assim, afastada qualquer probabilidade de contaminação, algumas observações de mutação foram registadas. *

Receiosos de nos alheirmos do assunto e tendo em vista apenas chamar atenção para a variabilidade dos bacterios do ponto de vista morfolojico e biolojico e a dificuldade em que muitas vezes nos encontramos para identificar um germen, quer de recente

isolamento, quer de antiga data cultivado em meios artificiais encerramos aqui o trabalho.

Se no correr dos estudos surjirem outras observações que mereçam rejisto prometemos voltar ao assunto, então com amplitude maior.



BIBLIOGRAFIA

ALTMANN K u Rauth A — 1910 — Zeitschr f Immunitaets
Bd VII H 5 Pg 629-655.

BAERTHLEIN — 1911 — Cent f Bakt I Abt Ref Bd 50 Beiheft
Pg 128-134.

BAERTHLEIN — 1912 — Berl. Klin. Woch N. 4 Pg. 156-158.

BAERTHLEIN — 1912 — Deutsche Med. Woch Pg. 14-43.

BAERTHLEIN — 1912 — Cent f Bakt I Abt Orig Bd 66 Pg 21.

BAERTHLEIN — 1912 — Berl Klin Woch N. 16 Pg. 735-739.

BARBER, MARSHALL A — 1907 Kansas University Science
Bull. Vol. IV N. 3 ref Cent f Bakt II Abt Bd 23.

BEIJERINCK M. W. 1912 Folia microbiologica I Jahrg H 1|2
Pg 4-100.

BERNHARDT U ORNSTEIN — 1913 Berl. Klin. Woch Pg 16.

EGGDAERT R. J. — 1912 Deutsche Med Woch N. 22 Pg 1026-
1027.

BURK ARNOLD — 1908 Arch f Hyg Bd LXV 235-242.

BURRI Prof Dr. R 1909 Das Tuscheverfahren. Iena.

BURRI Prof Dr. R. 1910 Cent f Bakt I Abt Orig Bd 54 H 3
Pg 210.

BURRI Prof Dr. A 1910 Cent f Bakt II Abt Bd 28 N. 12-15
Pg 320-345.

BURRI, Prof. Dr. R u Düggeli, Dr. M 1909 Cent f Bakt I Abt
Orig Bd XLIX H 2 Pg 145-174.

DITHORN FRITZ 1913 Cent f Bakt I Abt Orig Bd 67 H 7 Pg
497-509.

EISENBERG PHILIPP 1912 Cent f Bakt I Abt Orig Bd 63 H 4/6 Pg 305-321.

GARBOWSKI 1907 Cent f Bakt II Abt Bd XIX N. 21/23 Pg 644-655 e Ns. 24/25 Pg 737-749.

GÖTTSCHLICH in Kolle u Wassermann Handbuch der pathogenen Mikroorganismen 2 e Auflage Bd I Pg 145-172.

GOZO, Moriya — 1909 Cent f Bakt I Abt Orig Bd 51 H 5 Pg 480-493.

GRUBER U RUDIN Fortpflanzung Vererbung u Rassenhygiene München 1911.

HAENDEL Dr. und Woithe Dr. 1910 Arb. a. d. Kais Gesundh Bd 34 H 1 Pg 17-40.

JAFFE R. 1912 Arch f Hyg Bd 76 VH 4/5 Pg. 144.

JAKOBSEN 1910 Cent f Bakt I Abt Orig Bd 56 H 3/4 Pg. 205-216.

KLEIN 1912 Diss. Med. Bonn.

KOWALESKI 1910 Zeits f. Hyg Bd 66 Pg 277-290.

KRUSE 1910 Lehrbuch der allgemeine Mikrobiologie.

LEUCKHARDT 1901 Ref Kochs Jahresb Pg. 81.

MANDELBAUM 1912 Cent f Bakt I Abt Orig Bd 63 H 1 Pg. 46-58.

MARKOFF 1912 Zeits f Infektionskrankh. parasit. Krankh. o Hyg. der Haustiere Bd 12 H 2 Pg 137.

MASSINI, Rudolf 1907 Arch f. Hyg Vol. LXI Pg 250-292.

MÜLLER, REINER 1911 Cent f Bak Orig I Abt Bd 58 H 2 Pg 96-106.

NEISSER, M 1906 Cent f Bakt I Abt Ref Bd 38 Beih Pg 98-102.

NEUFELD Dr. u Haendel Dr. 1907 Arb. a. d. Kais Gesundh Bd 26 Pg 536-552.

NEUMANN 1897 Arch f Hyg Bd XXX.

OTA 1911 Mitt. d Med. Gesells zu Osaka Bd X H 7.

PRINGSHEIM 1910 Die Variabilität niedere Organismen. Springer. Berlin.

PRINGSHEIM 1912 Berl. Klin. Woch N. 31 Pg 1455.

RENÉ Edmond et Baudet, Floribert 1911 Cent f Bakt Orig I Abt Bd 60 H 6 Pg 462-480.

RUCZICKI 1899 Arch. f. Hyg. Bd. XXXIV Pg 149.

SEIFFERT, Dr. G. 1912 Zeits f Hyg Bd 71 H 3 Pg 561.

SELIGMANN u Sobernheim 1910 Deutsche Med. Woch n. 8 Pg 350-353.

STROMBERG, Heinrich 1911 Cent. f. Bakt. I Abt Orig. Bd 58 H 5 Pg 400-445.

THAYSEN A. C. 1913 Cent. f. Bakt. I Abt Ref Bd 56 Pg 110.

VAN L. BETEGH 1910 Cent. f. Bakt Orig Bd 54 H. 3 Pg 210.

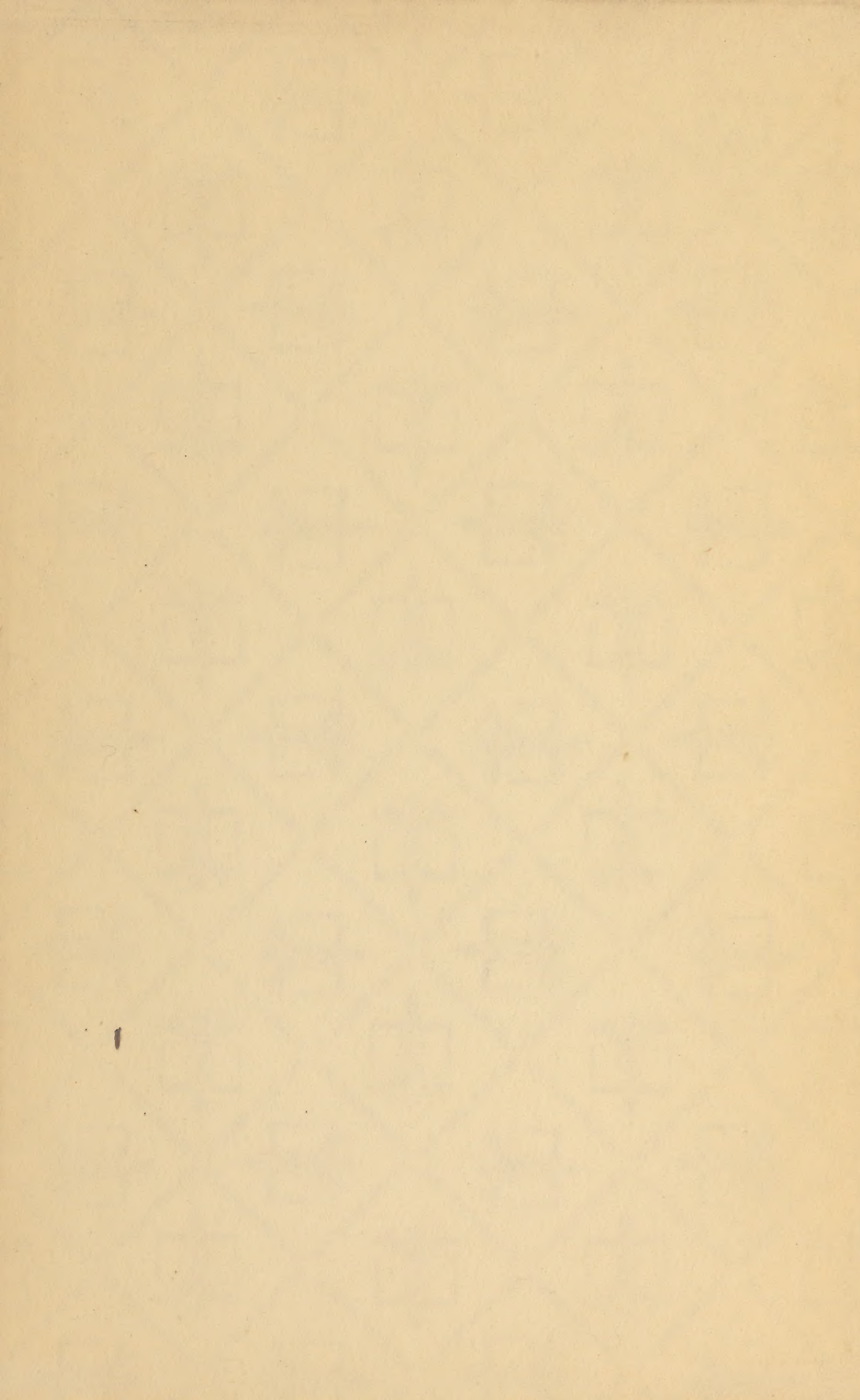
VAN LOGHEM J. J. 1911 Cent f. Bakt Orig Abt I Bd 57 H 5 Pg 384-387.

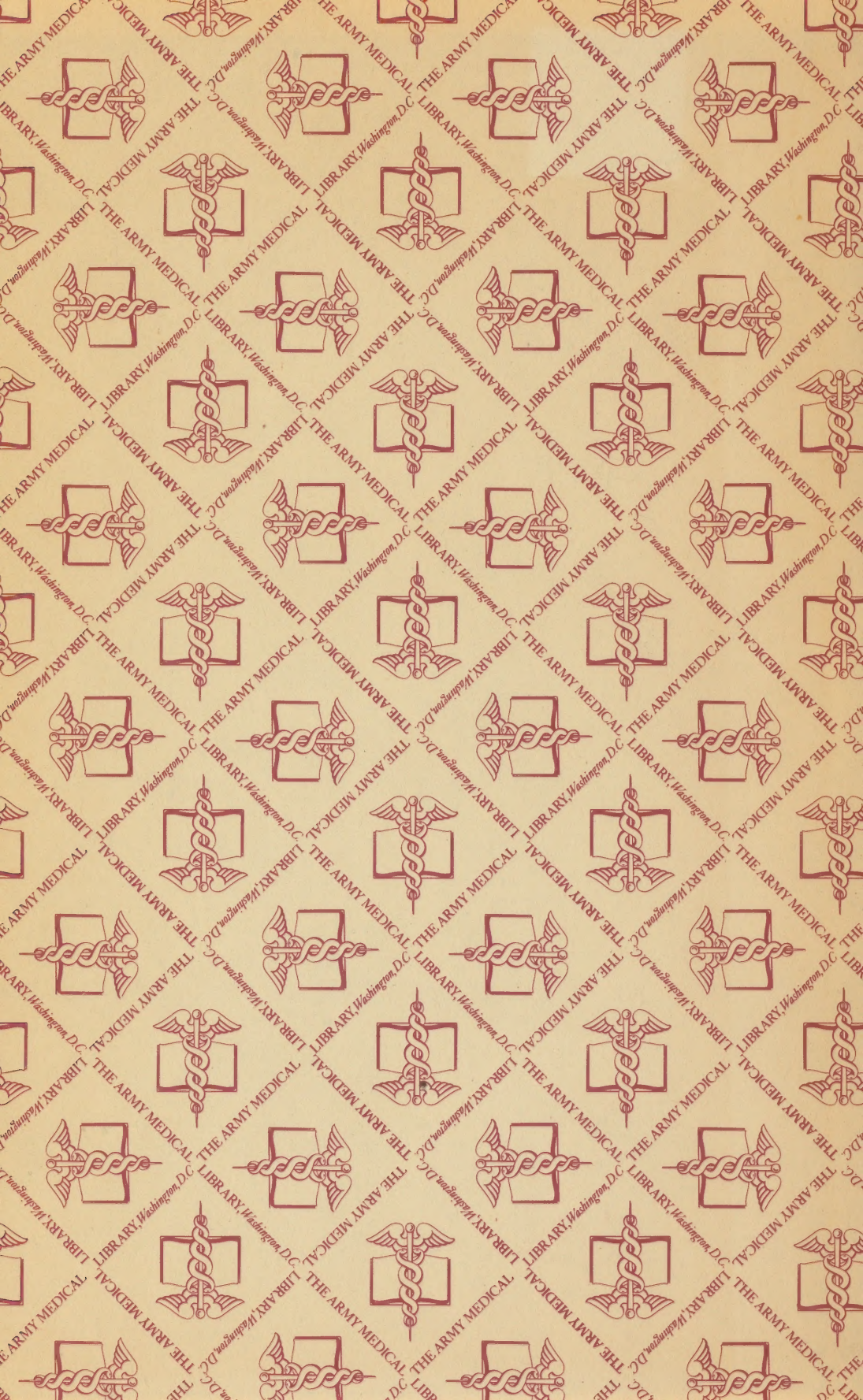
WOLF FRANZ 1909 Zeits f Indukt Abstammungs u Vererbungslehre Bd II H 2 Pg 90.











**SPEEDY
BINDER**



Manufactured by
GAYLORD BROS. Inc.
Syracuse, N. Y.
Stockton, Calif.

QW 51 M911c 1918

11330265R



NLM 05078563 0

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE